

## Peroxynitrite の電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルに及ぼす作用に関する研究

原 淳夫

Peroxynitrite が抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) を  $\text{Ca}^{2+}$  依存性に放出させること、また  $\text{Ca}^{2+}$  依存性神経伝達物質放出が細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入により誘発されることが知られていることから、本研究では初代培養マウス大脳皮質神経細胞への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を測定することにより、peroxynitrite により誘発される神経細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  流入機序について検討を行った。

Peroxynitrite は濃度および incubation 時間に依存した  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入の増加をもたらした。この流入増加は cyclic GMP 生成の有無にかかわらず認められたことから、cGMP 非依存性であることが判明した。神経細胞膜の脱分極阻害薬である tetrodotoxin、膜安定化剤である dibucaine および lidocaine は、いずれも用量依存性に peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を阻害した。Peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は P/Q 型および L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (VDCC) 阻害薬である  $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -ATX) および nifedipine により有意に抑制され、これら両阻害薬の同時存在下では完全に消失したが、N 型 VDCC 阻害薬である  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX) は影響を及ぼさなかった。一方、30 mM KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は peroxynitrite により有意に抑制され、その抑制の程度は  $\omega$ -CTX による抑制の程度と同程度であった。さらに、KCl および peroxynitrite の同時存在下で認められる  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は、nifedipine と  $\omega$ -ATX の同時添加で消失し、 $\omega$ -CTX は何らの影響も与えなかった。以上の結果から、peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は、peroxynitrite による神経細胞膜の脱分極を介した P/Q 型および L 型 VDCCs の活性化に起因しており、N 型 VDCC は peroxynitrite により抑制されることが明らかとなった。

(平成10年9月30日受理)

### Mechanisms for Peroxynitrite-induced $\text{Ca}^{2+}$ Influx into Mouse Cerebral Cortical Neurons

Atsuo HARA

Effect of peroxynitrite ( $\text{OONO}^-$ ) on voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCCs) was examined by measuring  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx into mouse cerebral cortical neurons.  $\text{OONO}^-$  increased  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx in time- and dose-dependent manners. Cyclic GMP formation did not alter the  $\text{OONO}^-$ -induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx. Tetrodotoxin and membrane stabilizers such as lidocaine and dibucaine dose-dependently suppressed the  $\text{OONO}^-$ -induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx. Each of nifedipine and  $\omega$ -agatoxin VIA ( $\omega$ -ATX) significantly inhibited the  $\text{OONO}^-$ -induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx and concomitant presence of these

agents completely abolished the influx, while  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX) showed no effects on the influx. On the other hand, OONO<sup>-</sup> itself significantly decreased 30 mM KCl-induced [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx to the level of [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx induced by OONO<sup>-</sup> alone and to the level of KCl-induced [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx determined in the presence of  $\omega$ -CTX. In addition, the influx by both KCl and OONO<sup>-</sup> disappeared by in the concomitant presence of nifedipine and  $\omega$ -ATX. These results indicate that OONO<sup>-</sup> increases [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx into neurons through opening P/Q- and L-typed VDCCs subsequent to depolarization of neuronal membrane and that has an inhibitory action on N-typed VDCC. (Accepted on September 30, 1998) *Kawasaki Igakkaishi* 24(3): 149-159, 1998

**Key Words** ① Peroxynitrite ② Ca<sup>2+</sup> influx  
③ Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels  
④ Mouse cerebral cortical neurons

## 緒 言

Peroxynitrite は nitric oxide (NO) と superoxide との急速な反応により形成され、きわめて強力な酸化作用を有している<sup>1),2)</sup>。この酸化作用は脂質過酸化<sup>3)</sup>、tyrosine や tryptophan などのアミノ酸のニトロ化<sup>4),5)</sup>をもたらす、マクロファージなどが示す殺菌作用<sup>6)</sup>に関与するのみならず、DNA 鎖の断裂<sup>7)</sup>および細胞毒性<sup>8)</sup>などを誘発することが知られている。

中枢神経系において、peroxynitrite は多くの神経細胞機能に変化をもたらすことが報告されている。Peroxynitrite による神経細胞機能の修飾として、acetylcholine や  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) などの神経伝達物質放出を誘発し<sup>9),10)</sup>、神経細胞における glutamate の細胞外から細胞内への輸送を阻害し<sup>11)</sup>、あるいは神経細胞のアポトーシスの誘発因子の1つである可能性<sup>12)</sup>などが報告されている。これらの peroxynitrite の神経細胞機能修飾作用のうち、peroxynitrite による神経伝達物質放出機序は、NO 誘発性神経伝達物質放出機序に類似していることが最近明らかにされている。すなわち、NO による抑制性神経伝達物質である GABA の大脳皮質神経細胞からの放出は、Ca<sup>2+</sup> 依存性放出機構および Na<sup>+</sup> 依存性 GABA 担体輸送機構の逆過程の2つの異なる放出機構を介して行われる<sup>13)</sup>。また、peroxynitrite による GABA の放出に関して

も、上述の NO による GABA 放出機構と同様の放出機構を介していることが報告されている<sup>14)</sup>。さらに、superoxide の消去剤である Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase の存在下では、NO 誘発性神経伝達物質放出が完全に消失することから、NO 誘発性神経伝達物質放出には peroxynitrite が関与している可能性が高いことが指摘されている<sup>9),10)</sup>。

上述した2つの異なる放出機構のうち、Ca<sup>2+</sup> 依存性放出は細胞外から細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入が誘因となっていると考えられている。NO 誘発性 GABA 放出の場合にも、細胞外液中の Ca<sup>2+</sup> の除去により、Ca<sup>2+</sup> 依存性 GABA 放出が完全に消失することが報告されている<sup>13)</sup>。したがって、NO は細胞外から細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入を誘発する可能性が極めて高いものと考えられる。事実、初代培養マウス大脳皮質神経細胞では、NO は神経細胞膜の脱分極を介した P/Q および L 型の電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルの活性化により、細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入をもたらすことが明らかにされている<sup>15)</sup>。一方、NO は N 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルに対しては抑制的に作用していることも報告されている<sup>15)</sup>。Peroxynitrite も NO の場合と同様に Ca<sup>2+</sup> 依存性 GABA 放出を誘発することから、細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入の増大を生じさせる可能性が考えられるが、その機序に関しては明らかにされていない。

本研究では、これらの点を解明する目的で、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、神経



細胞への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を測定することにより検討を行った。

### 実験材料および実験方法

#### 1) 大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

大脳皮質神経細胞の単離および初代培養は、既報に準じて行った<sup>9)</sup>。すなわち、胎齢15日目の ddY 系マウス胎児より新皮質を摘出し、髄膜を除去した後、 $\text{Ca}^{2+}$ -free Puck's 液中で剪刀を用いて細切し、0.1% trypsin による処理を加え、ついでパスツールピペットにより残存した組織片を機械的に破碎した。この細胞懸濁液に遠心操作 ( $900 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 2分) を加え、沈渣を得た。得られた沈渣を15%ウシ胎児血清を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) により浮遊させ、細胞数を  $3 \times 10^6$  個/ml となるように調整し、使用前に24時間 poly-L-lysine ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で処理した培養皿 (直径: 35 mm) に添加した。この細胞を  $37^\circ\text{C}$ 、湿度100%、95% 空気/5%  $\text{CO}_2$  の条件下で3日間培養した。ついで  $10 \mu\text{M}$  cytosine arabinoside および10%ウマ血清を含有する DMEM 中で24時間培養することにより、非神経細胞の増殖を抑制し、その後、10%ウマ血清含有 DMEM 中で培養を継続した。培養液は4日毎に新鮮な10%ウマ血清含有 DMEM に交換し、培養後14日目の神経細胞を実験に使用した。

#### 2) 神経細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の測定

初代培養マウス大脳皮質神経細胞への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入の測定は既報に準じて行った<sup>15)</sup>。すなわち、神経細胞を 20 mM HEPES を含有する  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB-HEPES: pH 7.4, 137 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM glucose) 中で  $37^\circ\text{C}$  10分間の incubation を行ったのち、予め  $37^\circ\text{C}$  に保温した新鮮な  $\text{Ca}^{2+}$ -free KRB-HEPES と交換した。反応は  $2.7 \text{ mM } ^{45}\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$  ( $1 \text{ mCi } ^{45}\text{Ca}^{2+} / \text{dish}$ ) を添加することにより開始した。神経細胞を  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の存在下に  $37^\circ\text{C}$  で1分間の incubation

を行ったのちに、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を含有する  $\text{Ca}^{2+}$ -free KRB-HEPES を吸引除去し、さらに氷冷した KRB-HEPES で神経細胞を5回洗浄することにより、反応を停止させた。この反応停止の操作は45秒以内に行った。その後培養皿に 0.5 M NaOH を添加し、神経細胞を培養皿より rubber policeman を用いて剥離した。神経細胞を溶解したアルカリ溶液の1部をシンチレーションバイアルに移し、酢酸で中和したのち、液体シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターにより細胞内に集積された放射活性を測定した。Peroxynitrite および 30 mM KCl の添加は  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の添加5秒前に行った。それぞれ L 型、P/Q 型、および N 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (VDCC) 阻害薬である nifedipine,  $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -ATX), および  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX), ならびに膜脱分極阻害薬である tetrodotoxin (TTX), dibucaine および lidocaine は、KCl または peroxynitrite の添加直前に添加した。30 mM KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入に対する VDCC 阻害薬の検討には、KCl 添加後1分間の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を測定した。

#### 3) Cyclic GMP (cGMP) の測定

神経細胞中の cGMP 含量の測定は既報に準じて行った<sup>16)</sup>。神経細胞を 1 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine を含んだ KRB-HEPES 中で  $37^\circ\text{C}$ 、10分間の incubation を行ったのち、 $5 \mu\text{M}$  peroxynitrite を添加することにより反応を開始した。1分間の incubation ののちに、KRB-HEPES を吸引除去し、ついで 6% trichloroacetic acid (TCA) を加えて反応を停止させた。反応停止後、神経細胞を培養皿から剥離し、超音波による破碎を行い、 $2,500 \times g$  にて15分間遠心を行った。得られた上清中の TCA は水飽和 diethyl ether により除去した。この上清を凍結乾燥し、残留物を sodium acetate に溶解し、その溶液の1部を用いて cGMP 測定用 [ $^{125}\text{I}$ ] ラジオイムノアッセイキットにより cGMP を測定した。cGMP 生成に関与する guanylate cyclase の阻害薬である methylene blue の作用を検討する場合には、preincubation および incubation 期間中に使用し

た KRB-Hepes はすべて methylene blue を含有したものを用いた。なお、本研究で使用した methylene blue の濃度では、神経細胞からの細胞外への lactate dehydrogenase の漏出の増加は認められなかった。

#### 4) Peroxynitrite の合成

Peroxynitrite は既報の方法に準じて合成した<sup>17)</sup>。0.6 M NaNO<sub>2</sub> および 0.6 M HCl/0.7 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を直径 3 mm, 長さ 2.5 cm のチューブ中で混合し、生成された peroxynitrite を 1 M NaOH によって安定化させた。4 g の MnO<sub>2</sub> を充填したカラム (直径 1 cm, 長さ 5 cm) に上述の合成した peroxynitrite を適用し、反応液中の過剰の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を除去し、カラムからの溶出液を -20°C で凍結させた。凍結後、黄色の上層部をかき集め、融解させたのちに、peroxynitrite の濃度を波長 302 nm における吸光度を測定することにより確認した<sup>9)</sup>。本研究において合成した peroxynitrite の濃度は約 100 mM であった。合成した peroxynitrite は合成後 24 時間以内に使用した。1 ml の KRB-Hepes への 10 mM peroxynitrite 10 μl の添加は、KRB-Hepes の pH に影響を与えなかった。

#### 5) 蛋白質の定量

神経細胞に含有される蛋白量は、0.5 M NaOH に溶解した神経細胞を試料として用い、ウシ血清 albumin を標準物質として、Lowry らの方法<sup>18)</sup>により測定した。

#### 6) 統計学的解析

それぞれのデータは mean ± S.E.M. で表示した。one-way ANOVA の適用後、それぞれの図表の説明文中に記載した統計処理法により、統計的有意差の検討を行った。

#### 7) 試薬

[<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] Cl<sub>2</sub> (0.3511 GBq/mg) および cGMP [<sup>125</sup>I] ラジオイムノアッセイキットはそれぞれ New England Nuclear (Boston, U. S. A.) および Amersham International plc. (Amersham, U. K.) より購入した。TTX および nifedipine は和光純薬株式会社 (大阪) の製品を使用した。また、ω-ATX および ω-CTX はペプチド研究所 (大阪)、

dibucaine は Sigma Chemicals (St. Louis, U. S. A.), methylene blue は E. Merck (Darmstadt, Germany) よりそれぞれ入手した。使用したその他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

なお、本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 96-126 1997), 川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施した。

## 実験結果

### 1) 神経細胞における [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に及ぼす peroxynitrite の作用

初代培養マウス大脳皮質神経細胞への [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入は、5 μM の peroxynitrite の KRB-Hepes への添加後 2 分間までは直線的に増加するのが観察された (Fig. 1)。また、peroxynitrite 添加後 1 分後における [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入量は、peroxynitrite 非存在下において認められる [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入量 (基礎流入量) に比して有意に大きいことが観察された (Fig. 1)。これらの実験成績から、以後の [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入実験における incubation 時間を 1 分とした。

Peroxynitrite は速やかに hydroxyl radical, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> などに分解されることが報告されている<sup>19)</sup>。従って、Ca<sup>2+</sup>-free KRB-Hepes に 5 μM の peroxynitrite を添加し、37°C, 1 分間の incubation を行ったのち、この Ca<sup>2+</sup>-free KRB-

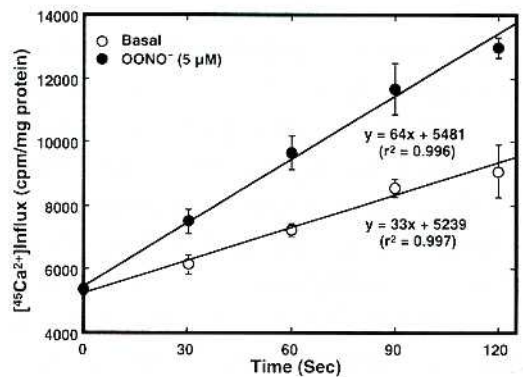
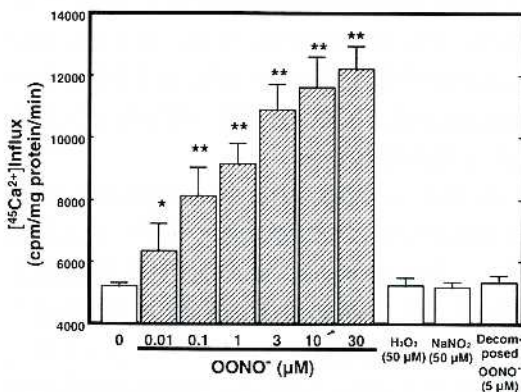


Fig. 1. Time course of [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx by OONO<sup>-</sup> (5 μM) into mouse cerebral cortical neurons. Each value represents the mean ± S.E.M. determined from three separate experiments.



Hepes を神経細胞に曝露した場合の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を検討したところ、**Figure 2** に示すように分解された peroxynitrite は神経細胞への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入には影響しないことが明らかとなった。また、peroxynitrite の合成材料である  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  および  $50 \mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$  はいずれも  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入には影響を与えなかった (**Fig. 2**)。なお、今回実験に用いた  $\text{H}_2\text{O}_2$  および  $\text{NaNO}_2$  の濃度を  $50 \mu\text{M}$  とした理由は、合成直後の peroxynitrite 濃度が約  $100 \text{ mM}$  であり、本研究で用いた peroxynitrite の最終濃度が  $5 \mu\text{M}$  であったことから、合成材料の最終濃度は少なくとも  $20,000$  倍以上に希釈されているものと考えられる。さらに、合成材料の合成時の濃度が、 $\text{H}_2\text{O}_2$  では  $600 \text{ mM}$ 、 $\text{NaNO}_2$  では  $700 \text{ mM}$  であることから、仮に peroxynitrite 含有溶液中にこれら合成材料が含有されていたとしても、peroxynitrite と同様に実験系に添加された時点では  $20,000$  倍以上に希釈されていると考えられるためである。

神経細胞への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入に及ぼす peroxynitrite の用量依存性を検討した結果、得られた成績を示したのが **Figure 2** である。Peroxynitrite は用量依存性に  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を増加させ、 $10 \sim 30 \mu\text{M}$  の濃度で最大の作用を示した。従って、以下の実験では peroxynitrite の濃度を submaxi-

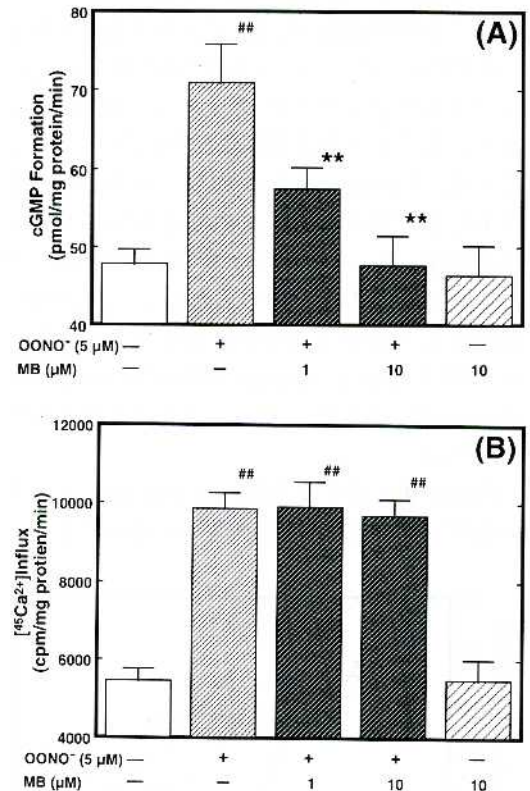


**Fig. 2.** Effects of various concentrations of  $\text{OONO}^-$  on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx was measured 1 min after the addition of  $\text{OONO}^-$ . Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. determined from four separate experiments. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , compared with the basal influx (Dunnett's test).

mal な濃度である  $5 \mu\text{M}$  とした。

## 2) Peroxynitrite 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入に及ぼす cGMP 生成の影響

最近の研究から、peroxynitrite が guanylate cyclase を活性化して cGMP 生成を増加させること<sup>20)</sup>、しかも cGMP は  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Na}^+$  チャネルを直接開口させること<sup>21)</sup>が報告されている。そこで、本研究ではまず peroxynitrite による  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入が cGMP を介して生じるか否かについて検討した。**Figure 3A** に示したように、 $5 \mu\text{M}$  の peroxynitrite は cGMP 生成を明らかに



**Fig. 3.** Effects of cyclic GMP (cGMP) formation on  $\text{OONO}^-$ -induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. determined from four separate experiments. (A) cGMP formation by  $\text{OONO}^-$  ( $5 \mu\text{M}$ ) and effect of methylene blue (MB) on  $\text{OONO}^-$ -induced cGMP formation. ##  $p < 0.01$ , compared with the basal value of cGMP (Bonferroni's test). \*\*  $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence  $\text{OONO}^-$  alone (Dunnett's test). (B) Effect of cGMP formation on  $\text{OONO}^-$  ( $5 \mu\text{M}$ )-induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx. ##  $p < 0.01$ , compared with the basal influx (Bonferroni's test).

亢進させた。この peroxynitrite の cGMP 生成促進作用は guanylate cyclase の阻害薬である methylene blue により完全に拮抗されたが、methylene blue 単独では cGMP の基礎生成量に影響を与えなかった (Fig. 3A)。一方, peroxynitrite による  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は, methylene blue の存在下, および非存在下のいずれの場合にも同じだけ増加した (Fig. 3B)。これらの実験成績から, peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は cGMP により影響を受けないことが判明した。

### 3) Peroxynitrite 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす TTX および膜安定化剤の影響

$\text{Ca}^{2+}$  が神経細胞に流入するには少なくとも2つの経路が存在していることが知られている。1つは電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (VDCC) であり, もう1つが受容体依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルである。Peroxynitrite がこれらのいずれの経路を介して  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入を生じるのかについて検討を行った。本研究ではまず前者の経路を介して起こるか否かを調べるために, 脱分極を抑制する TTX および膜安定化作用を有する局所麻酔薬である lidocaine および dibucaine の peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入に及ぼす影響を調べた。

Figure 4 に示すように, peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入はこれらの薬物のいずれによって

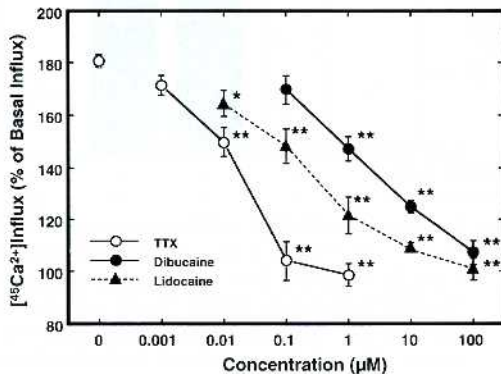


Fig. 4. Effects of tetrodotoxin (TTX), dibucaine and lidocaine on  $\text{OONO}_2$ -induced  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. determined from four separate experiments. The basal influx of  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  was  $5912 \pm 288$  cpm/mg protein/min. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (Dunnett's test).

も, 用量依存性に阻害された。最大阻害濃度は TTX では  $0.1 \mu\text{M}$  で認められ, しかもこの濃度では  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  の基礎流入量には影響が認められなかった。同様の阻害効果が lidocaine および dibucaine によっても観察された。また, これらの薬物がその最大阻害作用を示す場合には, peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は完全に消失した。これらの結果から, peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は peroxynitrite 自体による神経細胞膜の脱分極に引き続く VDCCs の開口によって起こることが明らかになった。また, 脱分極の阻害により  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入が完全に阻害されたことから, 受容体依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介した受容体依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルは, peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  に関与しないものと推測される。

### 4) 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす諸種の VDCC 阻害薬の影響

Peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入が脱分極を介して生じることから, いずれの型の VDCCs が活性化されるのかを検討した。この検討に先立ち, 本研究に使用した神経細胞が VDCCs を有するか否か, またいずれの型の VDCCs を有しているのかについて検討した。30 mM KCl の曝露は電気刺激に極めて類似した神経細胞膜の脱分極を誘発することがよく知られていることから, 30 mM KCl の添加に伴う  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入と, それぞれ P/Q 型, N 型, および L 型の VDCC 阻害薬である  $\omega$ -ATX,  $\omega$ -CTX および nifedipine による KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入に及ぼす影響を検討した。

$\omega$ -ATX,  $\omega$ -CTX, および nifedipine はいずれも用量依存性に KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入を阻害し, また nifedipine,  $\omega$ -ATX, および  $\omega$ -CTX はいずれも  $1 \mu\text{M}$  の濃度で最大阻害作用を示した (Fig. 5)。なお,  $0.1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX による阻害の程度と  $1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX による阻害の程度には有意差が認められた (Fig. 5)。これらの結果から, 本研究で用いた初代培養マウス大脳皮質神経細胞は上述したすべての VDCCs を有しており, しかもこれらの VDCCs は機能を有することが明らかとなった。



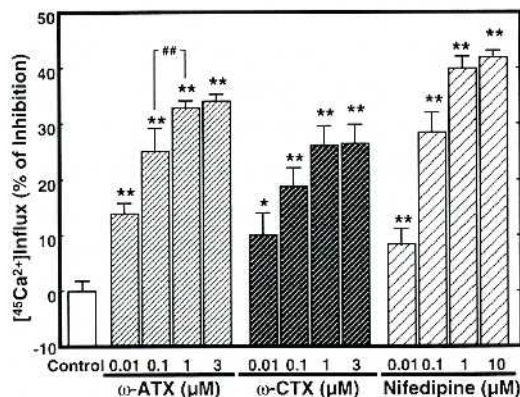


Fig. 5. Effects of various inhibitors for VDCCs on 30 mM KCl-induced [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx. Each value represents the mean ± S.E.M. determined from four separate experiments. \*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with the control influx (Dunnett's test). ##p<0.01 (Bonferroni's test).

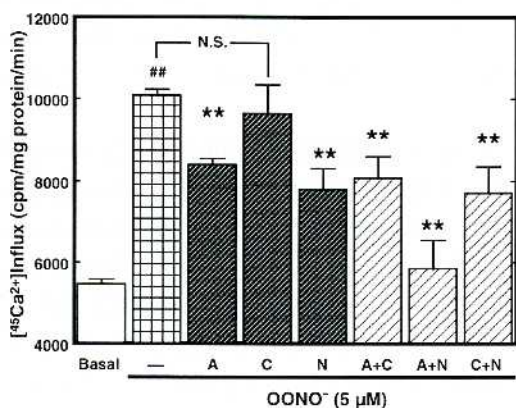


Fig. 6. Effects of various inhibitors for VDCCs on OONO<sup>-</sup> (5 μM)-induced [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx. Each value represents the mean ± S.E.M. determined from four separate experiments. ##p<0.01, compared with the basal influx (Bonferroni's test). \*\*p<0.01, compared with the value determined in the presence of OONO<sup>-</sup> alone (Bonferroni's test). N: nifedipine (1 μM), A: ω-ATX (1 μM), C: ω-CTX (1 μM). N.S.: not significant.

#### 5) Peroxynitrite 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に及ぼす 諸種の VDCC 阻害薬の影響

前項に示したように、本研究に使用している神経細胞には P/Q 型、N 型、および L 型の VDCCs が存在することから、次に諸種の VDCC 阻害薬を用いて、peroxynitrite 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に及ぼす影響について検討を加えた。

1 μM ω-ATX と 1 μM nifedipine は peroxynit-

rite 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入を有意に阻害したが、1 μM ω-CTX は peroxynitrite 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に影響を与えなかった (Fig. 6)。また、1 μM ω-ATX と 1 μM nifedipine の同時添加は、peroxynitrite の [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入促進作用を完全に消失させた (Fig. 6)。一方、nifedipine と ω-CTX、および ω-ATX と ω-CTX の同時存在下では、それぞれ nifedipine 単独、および ω-ATX 単独時と同程度の peroxynitrite 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入阻害作用が観察された。これらの結果は、peroxynitrite は神経細胞膜脱分極を介して P/Q 型および L 型 VDCCs を開口し、他方 N 型 VDCC を阻害する可能性を示唆するものと考えられる。

#### 6) Peroxynitrite および 30 mM KCl の同時存在下における [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に及ぼす諸種の VDCC 阻害薬の影響

Peroxynitrite が N 型 VDCC を抑制する可能性が考えられたことから、30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に及ぼす peroxynitrite の影響を検討したところ、Figure 7 に示すように、30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入は有意に阻害された。しかも、

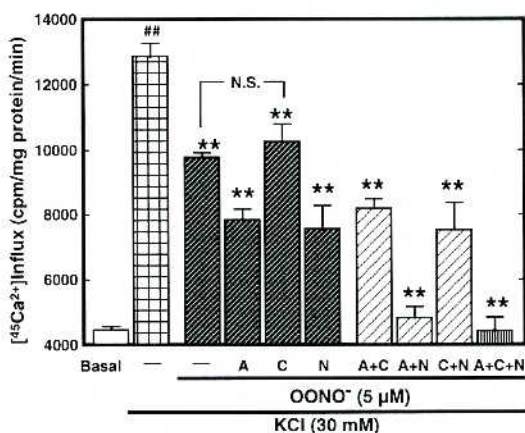


Fig. 7. Effects of OONO<sup>-</sup> (5 μM) and various inhibitors for VDCCs on 30 mM KCl-induced [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] influx. Each value represents the mean ± S.E.M. determined from four separate experiments. ##p<0.01, compared with the basal influx (Bonferroni's test). \*\*p<0.01, compared with the value determined in the presence of KCl alone (Bonferroni's test), A: ω-ATX (1 μM), C: ω-CTX (1 μM), N: nifedipine (1 μM) N.S.: not significant.

KCl と peroxynitrite の同時存在下においてみられた  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入量は, KCl, peroxynitrite および  $\omega$ -CTX を同時に添加した場合に認められた流入量とほぼ同一であった (Fig. 7). この実験成績は peroxynitrite が N 型 VDCCs に対し阻害作用を有していることを示すものと考えられる. 一方, nifedipine と  $\omega$ -ATX の同時添加は, KCl と peroxynitrite の同時存在下で認められる  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入を完全に消失させた (Fig. 7). また KCl と peroxynitrite の同時存在下で認められる  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は, nifedipine と  $\omega$ -CTX の同時添加, および  $\omega$ -ATX と  $\omega$ -CTX の同時添加により有意に抑制されたが, その抑制の程度はそれぞれ nifedipine および  $\omega$ -ATX の単独添加により認められた阻害の強さと同一であった (Fig. 7).

## 考 察

NO は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性放出機構と  $\text{Na}^{+}$  依存性 GABA 担体輸送系の逆過程の 2 つの放出機構を介して GABA を放出することが報告されている<sup>13)</sup>. 上述の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 GABA 放出は細胞外から細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入により誘発されることが知られている. 初代培養マウス大脳皮質神経細胞において, NO は神経細胞膜の脱分極を誘発し, この結果, P/Q 型および L 型 VDCCs を開口させるとともに, N 型 VDCC の活性化を阻害するとされており<sup>15)</sup>, これらの VDCCs の活性化に伴って生じた  $\text{Ca}^{2+}$  流入が NO 誘発性 GABA 放出のうちの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性放出に関与している可能性が推測される. 一方, peroxynitrite により誘発される GABA 放出も, NO の場合と同様に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性放出機構と  $\text{Na}^{+}$  依存性 GABA 担体輸送系の逆過程の 2 つの放出機構を介して GABA を放出することが報告されている<sup>14)</sup> のみならず, NO による神経伝達物質放出には peroxynitrite が関与していることが明らかにされている<sup>9), 10)</sup>. 従って, 本研究では peroxynitrite 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入機序を, 初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて検討を行った.

本研究では, 神経細胞において peroxynitrite は cGMP 生成促進作用を有することが観察された. 同様の作用が血管内皮細胞においてもみられることが報告されている<sup>20)</sup>. また, cGMP は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性チャネルを直接活性化させて開口させることが知られている<sup>21)</sup>. 従って, peroxynitrite により生成された cGMP が peroxynitrite 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関与している可能性があることから, guanylate cyclase 阻害薬である methylene blue の存在下および非存在下における peroxynitrite 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入について検討したところ, methylene blue の存在の有無にかかわらず, peroxynitrite が  $\text{Ca}^{2+}$  流入を促進させることが認められた. 従って, peroxynitrite 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  流入には cGMP が関与していないことは明らかと考えられる. また, NO は peroxynitrite と同様に cGMP 生成を促進するが, NO による  $\text{Ca}^{2+}$  流入は cGMP 非依存性であることが報告されている<sup>15), 22)</sup>.

TTX および膜安定化作用を有する局所麻酔薬である lidocaine などが peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入を阻害することから, peroxynitrite により誘発される  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は脱分極を介して生じることは間違いないものと考えられる. Peroxynitrite は生体膜の  $\text{Na}^{+}$  に対する透過性を修飾すること<sup>23), 24)</sup> から, peroxynitrite による生体膜イオン透過性の変化が神経細胞膜の脱分極を誘発する可能性が考えられるが, 現在脱分極を誘発する機序については不明であり, 今後の研究課題と考えられる.

中枢神経系において, 神経細胞が少なくとも 4 種類の VDCCs, すなわち, P, Q, L, および N 型 VDCCs を有していることが報告されている<sup>25)</sup>. 本研究で使用した初代培養マウス大脳皮質神経細胞には, 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入がそれぞれ L 型, P/Q 型, N 型 VDCCs の阻害薬である 1  $\mu\text{M}$  nifedipine, 1  $\mu\text{M}$   $\omega$ -ATX, および 1  $\mu\text{M}$   $\omega$ -CTX により用量依存性に阻害され, これらすべての薬物の同時存在下では完全に阻害されたことから, 上述のすべての VDCCs を有していることが確認された. 本研



究で使用した nifedipine ( $1 \mu\text{M}$ ) の濃度は L 型 VDCC を阻害し、しかも  $\text{Na}^+$  および  $\text{K}^+$  チャネルへは影響を与えない濃度であると考えられる<sup>26)</sup>。また、 $30 \text{ mM}$  KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入に対する  $0.1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX の阻害効果は、 $1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX の阻害効果より有意に低いものであり、 $0.1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX は  $30 \text{ mM}$  KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を有意に阻害するのが観察されている。従来の報告から、 $\omega$ -ATX は  $100 \sim 200 \text{ nM}$  以下の濃度では選択的に P 型 VDCC を阻害し、この濃度より高い濃度では P 型および Q 型の両型の VDCCs を阻害することが報告されている<sup>27)~29)</sup>。従って、本研究で使用した  $\omega$ -ATX の濃度である  $1 \mu\text{M}$  は、P 型および Q 型 VDCCs をともに阻害していると考えられる。

本研究において得られた注目すべき知見の 1 つは、peroxynitrite が大脳皮質神経細胞の膜脱分極に引き続いて、P/Q 型および L 型 VDCCs を介して  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を増加させたことであり、一方、脱分極が生じているにもかかわらず、N 型 VDCC を介した  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入がみられなかったことである。 $\omega$ -CTX による peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入の阻害がみられないことの理由として、少なくとも 2 つの可能性が考えられる。その 1 つは本研究で使用した神経細胞には N 型 VDCC が欠如している可能性であるが、この点に関しては、上述したように  $30 \text{ mM}$  KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入が  $\omega$ -CTX により有意に阻害されたことから否定されると考えられる。

第 2 の可能性は、peroxynitrite が N 型 VDCC を阻害する可能性である。この可能性を明らかにするために、本研究において  $30 \text{ mM}$  KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入に及ぼす peroxynitrite の作用を検討した。KCl および peroxynitrite の同時存在下における  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は、KCl、peroxynitrite および  $\omega$ -CTX の同時存在下において認められた  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入と同程度であり、かつこの場合の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は peroxynitrite 単独により誘発される  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入量にほぼ等しいことが観察された。この実験成績と、 $\omega$ -

CTX は peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入に影響を与えないこと、KCl および peroxynitrite の同時存在下における  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入が  $\omega$ -CTX により影響を受けないこと、および KCl および peroxynitrite の同時存在下における  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入が nifedipine および  $\omega$ -ATX の同時添加により完全に消失すること、などの本研究で得られた実験成績を勘案すると、peroxynitrite が N 型 VDCC の阻害作用を有することは明らかと考えられるが、その阻害作用機序については明らかでない。

## 結 語

Peroxynitrite が  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) を  $\text{Ca}^{2+}$  依存性に放出させること、また一般に  $\text{Ca}^{2+}$  依存性神経伝達物質放出が細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入により誘発されることが知られていることから、本研究では初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、神経細胞への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を測定することにより、peroxynitrite により誘発される  $\text{Ca}^{2+}$  流入機序について検討を行い、以下の結果を得た。

1) Peroxynitrite は濃度および incubation 時間に依存性の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入増加を誘発した。この流入増加は cyclic GMP 生成の有無にかかわらず認められたことから、cGMP 非依存性であることが判明した。

2) 神経細胞膜脱分極阻害薬である TTX、膜安定化剤である dibucaine および lidocaine は、いずれも用量依存性に peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を阻害した。

3)  $30 \text{ mM}$  KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は P/Q 型、N 型、および L 型電位依存性 VDCC 阻害薬である  $\omega$ -ATX、 $\omega$ -CTX、および nifedipine によりそれぞれ用量依存性に抑制され、これら 3 者の共存下では KCl 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は完全に消失したことから、本研究で使用した神経細胞には、上述のすべての VDCCs が存在していることが判明した。

4) Peroxynitrite 誘発性  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は  $\omega$ -ATX

および nifedipine により有意に抑制され、これら両阻害薬の同時存在下では完全に消失したが、 $\omega$ -CTX は影響を及ぼさなかった。

5) 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は peroxynitrite により有意に抑制され、その抑制の程度は  $\omega$ -CTX による抑制の程度と同程度であった。さらに、KCl および peroxynitrite の同時存在下で認められる  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は、nifedipine と  $\omega$ -ATX の同時添加で消失し、 $\omega$ -CTX には何らの影響も与えなかった。

6) 以上の実験成績から、peroxynitrite 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は、peroxynitrite による神経細胞膜の脱分極を介した P/Q 型および L 型 VDCCs の活性化に起因しており、N 型 VDCC

は peroxynitrite により抑制されることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学薬理学教室大熊誠太郎教授に深甚なる謝意を表します。また、実験について終始助言、御協力を賜りました桂 昌司先生をはじめとする薬理学教室の皆様にも深く感謝いたします。また本研究の遂行にあたり御協力いただいた、RI センター、生化学センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、文部省科学研究費 (No. 10557247) の援助により行われた。

## 文 献

- 1) Blough NV, Zafiriou OC : Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* 24 : 3502 - 3504, 1985
- 2) Huie R, Padmaja S : The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18 : 195 - 199, 1993
- 3) Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA : Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation : The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288 : 481 - 487, 1991
- 4) Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Yhai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS : Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 198 : 431 - 437, 1992
- 5) Alvarez B, Rucco H, Kirk M, Barnes S, Freeman BA, Radi R : Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem Res Toxicol* 9 : 390 - 396, 1996
- 6) Zhu L, Gunn C, Beckman JS : Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 198 : 452 - 457, 1992
- 7) Szab C, Zingarelli B, O'Conner M, Salzman AL : DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 1753 - 1758, 1996
- 8) Szab C : DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase ; a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radical & Medicine* 21 : 855 - 869
- 9) Ohkuma S, Katsura M, Guo JL, Hasegawa T, Kuriyama K : Involvement of peroxynitrite in N-methyl-D-aspartate- and sodium nitroprusside-induced release of acetylcholine from mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 31 : 185 - 193, 1995
- 10) Ohkuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T, Kuriyama K : Nitric oxide-induced  $[^3\text{H}]$  GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. *J Neurochem* 65 : 1109 - 1114, 1995
- 11) Trotti D, Rossi D, Gjesdal O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A : Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* 271 : 5976 - 5979, 1996
- 12) Estéves AG, Radi R, Barbeito L, Shin JT, Thompson JA, Beckman JS : Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells ; evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. *J Neurochem* 65 : 1543 - 1550, 1995
- 13) Ohkuma S, Katsura M, Chen D-Z, Narihara H, Kuriyama K : Nitric oxide-evoked  $[^3\text{H}]$   $\gamma$ -aminobutyric acid release is



mediated by two distinct release mechanisms. *Mol Brain Res* 36 : 137–144, 1996

- 14) Ohkuma S, Katsura M, Guo JL, Narihara H, Hasegawa T, Kuriyama K : Role of peroxynitrite in [ $^3\text{H}$ ]  $\gamma$ -aminobutyric acid release evoked by nitric acid and its mechanism. *Eur J Pharmacol* 301 : 179–188, 1996
- 15) Ohkuma S, Katsura M, Hibino Y, Xu J, Shirotani K, Kuriyama K : Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 54 : 133–140, 1998
- 16) Ohkuma S, Kische M, Ma F-H, Kuriyama K : Alterations in receptor-coupled second messenger systems at up-regulated muscarinic receptors ; Analysis using primary cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 189 : 277–285, 1990
- 17) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620–1624, 1990
- 18) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Fall AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265–275, 1951
- 19) Pfeiffer SA, Gorren CF, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B : Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2 : 1 stoichiometry. *J Biol Chem* 272 : 3465–3470, 1997
- 20) Mayer B, Schrammel A, Kalt P, Koesling D, Schmidt K : Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J Biol Chem* 270 : 17355–17360, 1995
- 21) Garthwaite J, Boulton CL : Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57 : 683–706, 1995
- 22) Kureny DE, Moroz LL, Turner RW, Sharkey KA, Barnes S : Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide. *Neuron* 13 : 315–324, 1994
- 23) Bauer ML, Beckman JS, Bridges RJ, Fuller CM, Matalon S : Peroxynitrite inhibits sodium uptake in rat colonic membrane vesicles. *Biochem Biophys Acta* 1104 : 87–94, 1992
- 24) Wei EP, Kontos HA, Beckman JS : Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* 271 : H1262–H1266, 1996
- 25) Tareilus E, Breer H : Presynaptic calcium channels ; Pharmacology and regulation. *Neurochem Int* 26 : 539–558, 1995
- 26) Wu L, Karpinski E, Wang R, Pang PKT : Modification by solvents of the action of nifedipine on calcium channel currents in neuroblastoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345 : 478–484, 1992
- 27) Villarroya M, De la Fuente M-T, López MG, Gandía L, García AG : Distinct effects of w-toxins and various groups of  $\text{Ca}^{2+}$ -channels of chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 320 : 249–257, 1997
- 28) Toner C, Stamford JA : Involvement of N- and P/Q- but not L- or T-type voltage-gated calcium channels in ischaemia-induced striatal dopamine release in vitro. *Brain Res* 748 : 85–92, 1997
- 29) Currie KPM, Fox AP : Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J Neurosci* 17 : 4570–4579, 1997